

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : **02-024558**
 (43)Date of publication of application : **26.01.1990**

(51)Int.CI. **G01N 33/531**
G01N 33/563
G01N 33/577

(21)Application number : 63-174682	(71)Applicant : KONICA CORP
(22)Date of filing : 12.07.1988	(72)Inventor : UEMURA MORITO
	YAMAZAKI MASAHIKO
	YOSHIDA SHINYA

(54) IMMUNOASSAY

(57)Abstract:

PURPOSE: To prevent a measured value of an antigen from becoming smaller than an actual value, by preparing a calibration curve by using a standard specimen containing the antigen to be measured and an antiidio antibody or a variable-region fragment thereof for an antibody opposite to said antigen.

CONSTITUTION: An antiidio antibody or a variable-region fragment thereof are made to exist in a standard specimen which is used in preparation of a calibration curve. The antiidio antibody has a property of combining with a variable region of an antibody corresponding to an antigen in an antigen- antibody reaction. On the other side, the antigen combines also with a variable region of the antibody to which it corresponds, in the antigen-antibody reaction. Accordingly, the antigen and the antiidio antibody compete with each other in the antigen-antibody reaction with the antibody corresponding to the antigen, and therefore the antiidio antibody acts as an inhibiting substance against the antigen. In this way, a system being similar to an actual specimen wherein various inhibiting substances coexist is obtained, and the calibration curve according well with actual values and being excellent in linearity can be obtained.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]
 [Date of sending the examiner's decision of rejection]
 [Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]
 [Date of final disposal for application]
 [Patent number]
 [Date of registration]
 [Number of appeal against examiner's decision of rejection]
 [Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]
 [Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japan Patent Office

⑯ 日本国特許庁 (JP) ⑪ 特許出願公開
 ⑫ 公開特許公報 (A) 平2-24558

⑬ Int. Cl. 5

G 01 N 33/531
 33/563
 33/577

識別記号

府内整理番号

Z 7906-2C
 7906-2G
 A 7906-2G

⑭ 公開 平成2年(1990)1月26日

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全5頁)

⑮ 発明の名称 イムノアッセイ

⑯ 特 願 昭63-174682

⑰ 出 願 昭63(1988)7月12日

⑱ 発明者 植村 盛人 東京都日野市さくら町1番地 コニカ株式会社内
 ⑲ 発明者 山崎 誠彦 東京都日野市さくら町1番地 コニカ株式会社内
 ⑳ 発明者 吉田 伸也 東京都日野市さくら町1番地 コニカ株式会社内
 ㉑ 出願人 コニカ株式会社 東京都新宿区西新宿1丁目26番2号

四月 細 目

1. 発明の名称

イムノアッセイ

2. 特許請求の範囲

イムノアッセイにおいて、測定すべき抗原と、該抗原に対する抗体に対する抗イディオ抗体又はその可変領域フラグメントとを含む標準検体を用いて検量線の作製を行なうことを特徴とする方法。

3. 発明の詳細な説明

【産業上の利用分野】

この発明は、測定精度が改善されたイムノアッセイに関する。

【従来の技術】

イムノアッセイにおいては、種々の既知濃度の測定すべき抗原を含む標準検体(キャリブレーター)を用いて検量線を作製し、検体について測定された値を検量線にあてはめて検体中の測定すべき抗原の量を求める。従来のイムノアッセイにおいては、検量線の作製のために用いられる標準

検体は精製された抗原を既知量含んでいる。

一方、イムノアッセイにおいて、測定に供される検体は血液等の体液であり、測定すべき抗原の他に多種多様な種々の物質を含んでいる。これらの種々の阻害物質が抗原抗体反応を妨害するため、検量線に基づいて測定された抗原の測定値は実際の値よりも低くなる。換言すると、検量線の直線性が悪化する。大量の検体についてイムノアッセイを行なう場合に、検体を希釈することなく原液のままで測定できれば労力及び時間がかかる非常に有利であるが、上記現象は抗原抗体反応を妨害する物質が多く存在すればするほど顕著になるので、血液等の検体を希釈せずに原液のままで測定する場合に特に問題になる。

この問題は、もし、検量線の作製に用いる標準検体として、検体と同様な種々の阻害物質を含む系の液を用いて検量線を作製すれば解決できるものと考えられるが、これらの阻害物質は通常単一のものではなく、これらを同定して目的とする濃度に調製することは極めて困難である。

【発明が解決しようとする問題点】

従って、この発明の目的は、検体を希釈せずに原液のまま測定した場合にも、測定値が実際の値よりも実質的に低くならず、正確に実際の値を測定することができるイムノアッセイを提供することである。

【問題点を解決するための手段】

本願発明者らは、錦章研究の結果、検量線を作製する際に、標準検体中に、測定すべき抗原に応する抗体に対する抗イディオ抗体を存在させると、抗原と抗イディオ抗体とが競合することにより抗原抗体反応が妨害され、実際の検体と同じような系が得られ、従って、抗原の測定値が実際の値よりも小さくなることを防止することができることを見出しこの発明を完成した。

すなわち、この発明は、イムノアッセイにおいて、測定すべき抗原と、該抗原に対する抗体に対する抗イディオ抗体又はその可変領域フラグメントとを含む標準検体を用いて検量線の作製を行なうことを特徴とする方法を提供する。

従って、抗イディオ抗体は、抗原に対応する抗体の可変領域と抗原抗体反応により結合する性質を有する。一方、抗原もその対応する抗体の可変領域と抗原抗体反応により結合する。従って、抗原と抗イディオ抗体とは、抗原に対応する抗体との抗原抗体反応において競合し、このため、抗イディオ抗体は抗原に対して阻害物質として働く。このようにして、種々の阻害物質が共存する現実の検体と同様な系が得られ、実際の値と良く一致した、直線性の優れた検量線を得ることができる。

この発明のイムノアッセイにおいて用いられる抗イディオ抗体は、モノクローナル抗体であることが好ましい。

標準検体中に抗原と共に含まれるものは抗イディオ抗体自身であってもよいし、F_{ab}フラグメント等の可変領域のフラグメントであってもよい。

検量線を作製するための標準検体中の抗イディオ抗体の濃度は、特に限定されないが、通常

【発明の効果】

この発明のイムノアッセイによると、測定すべき抗原とそれに対応する抗体との抗原抗体反応において、抗イディオ抗体が抗原と競合するので、抗原抗体反応が妨害され、測定に供される血液等の検体と同じような系がもたらされる。従って、イムノアッセイにより測定される抗原の測定値が実際の値よりも小さくなることが防止され、正確な抗原量を測定することができる。特に、従来のイムノアッセイと比較して、検体を原液のまま測定する場合に測定精度が大きく向上したので、大量の検体について測定を行なう場合に検体を希釈せずに測定することができ、時間及び労力を節約することができ有利である。

【発明の具体的説明】

この発明のイムノアッセイは、検量線を作製する際に用いる標準検体中に抗イディオ抗体又はその可変領域フラグメントを存在させることを特徴とする。抗イディオ抗体は、抗原に対応する抗体の可変領域をエピトープとする抗体である。

1 ng/ml ないし 100 μg/ml 程度であり、好ましくは 10 ng/ml ないし 10 μg/ml 程度である。また、標準検体中に抗イディオ抗体の可変領域フラグメントが含まれる場合には、その濃度は通常 1 ng/ml ないし 100 μg/ml であり、好ましくは 10 ng/ml ないし 10 μg/ml 程度である。

この発明のイムノアッセイに用いられる抗体は従来と同様であり、測定精度の観点からモノクローナル抗体であることが好ましい。

この発明のイムノアッセイにより測定される抗原は、いかなる抗原であってもよい。

この発明のイムノアッセイはいかなる様式のものであってもよく、従って、競合法でもサンドイッチ法でもよい。また、EIA、RIA、FIA、ラテックス凝集法等、いかなる種類のイムノアッセイであってもよい。

【実施例】

以下、この発明を実施例に基づいて詳細に説明するが、この発明は下記実施例に限定されるものではない。

以下の実施例において、GT-II（ガラクトース転移酵素イソ酵素-II）を測定するためのエンザイムイムノアッセイにおける本発明の例について述べる。

抗GT-IIモノクローナル抗体Mab 3872は特開昭62-174100号に記載の方法により作製され、これを產生するハイブリドーマがATCCに寄託されており、その受託番号はHB 8945である。一方、Mab 3872に対する抗イディオモノクローナル抗体Mab 5714は特願昭62-49148号記載の方法により作製され、これを產生するハイブリドーマが散研に寄託され、その受託番号は散研研条寄第1759号である。Mab 5714のF_{ab}フラグメントは、"Monoclonal Antibodies: Principles and Practice", Academic Press, Inc.第120頁に記載された方法により調製された。

実施例1、比較例1

a) 標準検体の調製

癌患者腹水より精製されたGT-IIを5%ウシ血清アルブミン(BSA)及び100ng/mlの

BSA含有PBS)200μlを加え、室温で2時間放置した。

PBSで4回ビーズを洗浄後、o-フェニレンジアミン3mg/mlクエン酸バッファー(pH5.0)500μlを加え室温で30分間発色反応させた。1N硫酸2mlを加えて反応を停止させた後、490nmの吸光度を分光光度計により測定した。結果を表1に示す。

表1

GT-II濃度	比較例1	対照	実施例1
0 U/ml	0.030	0.045	0.032
20 U/ml	0.245	0.220	0.216
50 U/ml	0.485	0.453	0.449
150 U/ml	1.274	1.085	1.090

以上の結果から、抗イディオ抗体を含む標準検体を用いた本発明の実施例1の測定結果が実験の血清を用いて調製した対照の標準検体を用いた

Mab 5714 F_{ab}フラグメントを含むリン酸緩衝食塩水(PBS)に、所定濃度(0, 20, 50, 150U/ml)に溶解し、標準検体とした(実施例1)。一方、比較のため、Mab 5714 F_{ab}フラグメントを含まない5%BSA含有PBSに同濃度のGT-IIを溶解し、標準検体とした(比較例1)。さらに、対照として、GT-IIを含まない正常人プール血清に上記濃度のGT-IIを溶解して標準検体とした(対照)。

b) GT-IIエンザイムイムノアッセイ

精製したMab 3872 10μg/ml 100mM炭酸バッファー(pH9.5)中、1/4インチのプラスチックビーズを4℃、1昼夜固定化した。PBSで3回洗浄後、1%BSA含有PBS中、37℃、2日間放置し、安定化した。

このビーズ1個に上記標準検体50μl及び200mM炭酸バッファー(pH9.5)200μlを加え、室温で18時間放置した。3回PBSでビーズを洗浄した後、1μg/mlのMab 3872-IRP(ホースラディッシュペルオキシダーゼ)結合体溶液(1%

場合の結果と非常によく一致しており、一方、抗イディオ抗体を含まない標準検体を用いた比較例1における測定結果は、実験の血清を用いた対照の結果からかなりずれていることがわかる。従って、本発明の方法によると、血清等の実験の検体を測定した場合により正確な結果が得られることがわかる。

実施例2、比較例2

希釈試験

阻害物質による阻害効果は、検体の希釈倍率を大きくすればするほど阻害物質が希釈されるので弱まり、測定結果は真の値に近づく。逆に、希釈倍率が低い場合には、阻害物質の影響を大きく受け、測定値は真の値よりも低くなる。従って、検体を種々の希釈倍率で希釈して抗原量を測定し、その結果を希釈倍率を横軸にとってプロットした場合に、低希釈倍率における測定結果が、高希釈倍率の領域の直線を外挿した直線から大きくなっているほど真の値と測定された値との誤差が大きいことになり、そのアッセイの精度が低いこ

とを示す。この例では、これを調べるために希釈試験を行なった。

実施例1及び比較例1のそれぞれの標準検体を用いて検量線を描き、希釈試験を行なった。検体はGT-II高値の糖尿病者血清を用い、希釈液としてはそれぞれの0 U/mlを用いた。結果を図に示す。

図から明らかなように、本発明の実施例2では低希釈倍率における測定値が、高希釈倍率における測定値を外挿した直線上にほぼのっているのに対し、比較例2ではこの直線よりもかなり下にある。従って、この発明の方法は比較例の方法に比べて精度が大きく優れていることがわかる。

実施例3、比較例3

添加回収試験

実施例1及び比較1におけるそれぞれの標準検体を用いて、以下の添加回収試験を行なった。3つの検体A、B又はC 1重量部に対し、下記表2及び3に示す濃度の標準検体1重量部を添加し、試料を作製した。イムノアッセイ操作は実施

表2

試料	実測値 (U/ml)	理論値 (U/ml)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
検体A + 0 U/ml	6.8	—	—	—
+10 U/ml	14.2	16.8	84.5	87.4
+25 U/ml	28.2	31.8	88.7	
+75 U/ml	72.9	81.8	89.1	
検体B + 0 U/ml	15.9	—	—	—
+10 U/ml	23.9	25.9	92.4	87.5
+25 U/ml	33.1	40.9	81.0	
+75 U/ml	81.1	90.9	89.2	
検体C + 0 U/ml	27.1	—	—	—
+10 U/ml	35.1	37.1	94.5	91.0
+25 U/ml	47.4	52.1	90.9	
+75 U/ml	89.5	102.1	87.7	

表3

試料	実測値 (U/ml)	理論値 (U/ml)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
検体A + 0 U/ml	5.5	—	—	—
+10 U/ml	16.3	15.5	105.2	100.4
+25 U/ml	29.8	30.5	97.7	
+75 U/ml	79.2	80.5	98.4	
検体B + 0 U/ml	14.5	—	—	—
+10 U/ml	25.1	24.5	102.4	97.9
+25 U/ml	38.2	39.5	96.7	
+75 U/ml	84.8	89.5	94.7	
検体C + 0 U/ml	24.1	—	—	—
+10 U/ml	34.9	34.1	102.3	97.6
+25 U/ml	45.5	49.1	92.7	
+75 U/ml	96.8	99.1	97.7	

表2及び3から、本発明の実施例3では、比較例3に比べて回収率がはるかに100%に近く、従って精度が高いことがわかる。

4. 図面の簡単な説明

図は本発明の実施例2及び比較例2についての希釈試験の結果を示す。

特許出願人 コニカ株式会社

